

**ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA E VIABILIDADE DE PLANTAS DE
Orthophytum mucugense Wand.e Conceição CONSERVADAS IN VITRO
Amanda Lima Pinheiro¹; Alone Lima Brito²; Andressa Priscila Piancó Lima³**

1. Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduando em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: amanda_pinheiro@hotmail.com

2. Orientadora, Departamento Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: lima_brito@yahoo.com.br

3. Doutoranda, Recursos Genéticos Vegetais Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: andressapianco@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Conservação *in vitro*; capacidade regenerativa; bromélias.

INTRODUÇÃO

Entre os gêneros de bromélias encontrados na Cadeia do Espinhaço está o *Orthophytum* (VERSIEUX et al., 2008). No estado baiano, é encontrada a espécie *Orthophytum mucugense* (Wand.e Conceição). Os relatos acerca da sua distribuição geográfica revelam que a sua ocorrência está restrita ao município de Mucugê – Chapada Diamantina (BELLINTANI, 2006). Esta espécie é considerada vulnerável por seu endemismo e por ser alvo de extrativismo (LIMA et al. 2012) sendo necessários estudos que visem a conservação desta espécie.

A cultura de tecidos vegetais pode ser uma opção viável para a conservação *ex situ* de *O. mucugense* através do crescimento mínimo. Esta técnica permite que uma grande quantidade de plantas seja conservada em um espaço físico reduzido, sem os riscos existentes no campo e mantendo a fidelidade genética, o que garante assim a disponibilidade de material para o intercâmbio de germoplasma e estudos de melhoramento genético (FARIA et al., 2006).

Não há relatos de estudos de conservação *in vitro* para *O. mucugense*, portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar os aspectos morfofisiológicos e a viabilidade das plantas de *Orthophytum mucugense* submetidas a conservação *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Unidade Experimental Horto Florestal pertencente a Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Foram utilizadas plântulas estabelecidas *in vitro* oriundas de sementes coletadas no Parque Nacional de Mucugê, município de Mucugê na Chapada Diamantina – BA.

As plântulas foram inseridas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 18 ml de meio de cultura MS ½ gelificado com 7 g.L⁻¹ de ágar, e diferentes concentrações de sacarose combinadas ou não com manitol, totalizando cinco tratamentos.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com 40 tubos por tratamento. Cada tratamento foi composto de dez repetições e quatro amostras por repetição (um explante por tubo). Em todos os experimentos o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e a esterilização foi realizada em autoclave a 120°C por 15 minutos.

Foram feitas avaliações mensais da sobrevivência das plantas, e após 300 dias de conservação foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência (%S), porcentagem de plantas com brotos (%PB) e número de brotos por planta (NBP), considerando todas as amostras de cada tratamento. Já para as análises de crescimento foram utilizadas 15

amostras de cada tratamento e foram avaliados: número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR), número de raízes (NR), matéria fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR), o teor de clorofila e a capacidade regenerativa.

A determinação do teor de clorofila foi realizada de acordo com a metodologia de Arnon (1949) com ajustes. Para tanto folhas verdes sadias foram destacadas das plantas conservadas *in vitro* e pesadas 0,5 g para cada amostra. Posteriormente estas folhas foram maceradas com 15 ml de acetona 80% e depois filtradas em papel filtro. A parte filtrada foi completada com acetona 80% para 25 ml e depois foi realizada a medida da absorbância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 645 e 663 nm.

Explantos caulinares com 0,5 cm e explantes foliares basais e radiculares com 1 cm de comprimento foram inseridos em tubo de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura suplementado com 30g.L de sacarose e 0,7% de ágar acrescido de 2,60 de ANA para os explantes caulinares (LIMA et al., 2015a) e 5,0 de 2,4 D para explantes radiculares e 5,0 de 2,4D com 2,5 de BAP para explantes foliares (LIMA et al., 2015b).

Para cada explante o delineamento foi inteiramente casualizado com 5 repetições e 5 amostras por repetição. Após 30 dias foram avaliadas a porcentagem de explantes responsivos e o número de brotos por explante. Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $26 \pm 3^\circ \text{C}$, fotoperíodo será de 16 h e radiação fotossintética ativa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa estatístico SISVAR 5.1 e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância a porcentagem de sobrevivência das plantas conservadas após 270 dias não foi influenciada pelo tratamento testado ($p \geq 0,05$). Foi obtida uma alta taxa de sobrevivência no experimento, sendo ela de 97,5%.

Para o NFV as médias obtidas nos tratamentos T3 e T4 os quais tiveram sacarose e manitol combinados foram superiores as dos tratamentos T1 e T2 suplementados com as maiores concentrações de sacarose, mas não diferiram estatisticamente entre si e do controle (Tabela 1).

Para o NFS a média obtida no T3 (5,46) com sacarose e manitol foi estatisticamente inferior as médias dos tratamentos T1(21,00) e T2 (19,06), e não diferiu estatisticamente do T4 (10,73), também composto por estas duas substâncias, e ambos não diferiram do controle (16,26) (Tabela 1).

Para CPA a média 5,51 obtida no controle com 30 g.L^{-1} de sacarose foi significativamente inferior à do T2 (6,72) com a maior concentração de sacarose 60 g.L^{-1} (tabela 1).

As médias para CMR obtidas nos tratamentos controle com 30 g.L^{-1} de sacarose e T3 com sacarose e manitol não diferiram entre si e foram significativamente inferiores às dos tratamentos T1 e T2 os quais continham as maiores concentrações de sacarose (45 e 60 g.L^{-1} , respectivamente), e não diferiram também do T4 (Tabela 1). Para o NR os tratamentos T2 e T4 apresentaram médias significativamente superiores à do controle (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito dos agentes osmóticos sacarose e manitol no número de folhas verdes (NFR), número de folhas senescentes (NFS), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR), número de raízes (NR), massa fresca da raiz (MFR), massa seca parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) das plantas *Orthophytum mucugense* conservadas *in vitro* durante 300 dias.

Tratamento	Sacarose	Manitol	NFV	NFS	CPA (cm)	CMR (cm)
Controle	30	0	36,06 ab	16,26 abc	5,51 b	3,74 b
T1	45	0	27,33 bc	21,00 a	6,02 ab	6,48 a
T2	60	0	25,20 c	19,06 ab	6,72 a	7,26 a
T3	30	7,8	37,93 a	5,46 c	5,82 ab	3,57 b
T4	45	7,8	39,26 a	10,73 bc	5,87 ab	5,74 ab
			NR	MFR (g)	MSPA (g)	MSR (g)
Controle	30	0	4,93 b	0,03 b	0,06 b	0,00 bc
T1	45	0	6,46 ab	0,05 ab	0,08 ab	0,02 ab
T2	60	0	7,26 a	0,08 a	0,09 a	0,02 a
T3	30	7,8	6,86 ab	0,04 b	0,06 b	0,00 c
T4	45	7,8	7,53 a	0,05 ab	0,07 ab	0,01 abc

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Nota-se que as médias para MFR e MSPA tiveram o mesmo comportamento com a maior média no tratamento T2 que continha a maior concentração de sacarose, e diferiu estatisticamente do T3 e do controle os quais continham a menor concentração desta substância (30 g.L⁻¹), mas não apresentou diferença significativa do T1 e T4 (Tabela 1). As médias dos tratamentos T1, T2 e T4, com as maiores concentrações de sacarose (45 e 60 g.L⁻¹), não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram os maiores valores para MSR (Tabela 1).

As melhores médias para %EFRC - explantes foliares responsivos a formação de calos-foram obtidas para as plantas provenientes dos tratamentos T2, T3, T4 e T5 e não diferiram estatisticamente entre si, mas apresentaram diferença significativa em relação ao T1 (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de explantes foliares responsivos a formação de calos (%EFRC) sobre efeito de 5,0 µM de 2,4-D com 2,5 µM de BAP em segmentos foliares de plantas conservadas por 300 dias em diferentes tratamentos com agentes osmóticos.

Meio de Conservação		Regeneração	
Sacarose	Manitol	Tratamentos 5 µM 2,4-D + 2,5 µM BAP	%EFRC
30	0	T1	24,99 b
45	0	T2	75,00 a
60	0	T3	91,66 a
30	7,8	T4	79,16 a
45	7,8	T5	70,83 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Quanto ao teor de clorofila das plantas conservadas os tratamentos apresentaram diferenças significativas para clorofila *a* e clorofila total. Para clorofila *aa* média obtida no

tratamento controle apresentou diferença estatística significativa das médias geradas nos tratamentos T2 e T3. Já para clorofila total o controle, suplementado com a menor concentração de sacarose 30 g.L⁻¹ e com o menor potencial osmótico, apresentou média estatisticamente superior apenas à do T2, que continha a maior concentração desta substância 60 g.L⁻¹ e maior potencial osmótico (Tabela 3). Esses resultados indicam que possivelmente o estresse hídrico causado pela adição de agentes osmóticos ao meio de cultura interferiu na síntese de clorofila.

Tabela 3. Teor de clorofila *a* e clorofila total das plantas conservadas por 300 dias em diferentes tratamentos com agentes osmóticos.

Tratamento	Sacarose	Manitol	Clorofila _a	Clorofila total
Controle	30	0	8,08 a	12,20 a
T1	45	0	3,41 ab	4,82 ab
T2	60	0	2,13 b	3,62 b
T3	30	7,8	2,07 b	4,73 ab
T4	45	7,8	4,65 ab	7, 57 ab

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

De modo geral o tratamento T4 contendo 45 g.L⁻¹ associado a 7,8 g.L⁻¹ de manitol apresentou bons resultados para as variáveis avaliadas, apesar de não ter diferido estatisticamente do tratamento controle para o CPA, NFV, NFS e CMR, apresentou melhores médias para MSPA , MSR e NR.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A associação de 45 g.L⁻¹ de sacarose com 7,8 g.L⁻¹ de manitol possibilita a conservação *in vitro* de *O. mucugense* por um período de 270 dias.

REFERÊNCIAS

- BELLINTANI, Moema Cortizo. **Estudos da propagação *in vitro* e *ex vitro* de *Neoregelia mucugensis* Leme, *Orthophytum mucugense* Wand e Conceição e *Orthophytum albopictum* Philcox, espécies de Bromeliaceae endêmicas da Bahia**. 2006. 115p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2006.
- FARIA, G. A. et al. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* NE Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, p. 267-270, 2006.
- FERREIRA, D.F. **SISVAR** Sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 2003. V.3, n.4.
- LIMA, C. O. D. C.; MARCHI, M. N. G.; LIMA-BRITO, A.; CARNEIRO, C. E.; BELLINTANI, M. C.; SANTANA, J. R. F. d. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. **Ciência Rural**. v.42, n. 2. 2012.
- VERSIEUX, L. M. et al. Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 98-110, 2008.
- WANDERLEY, M. das G. L.; CONCEIÇÃO, Abel Augusto. Notas Taxonômicas e uma nova espécie do gênero *Orthophytum* Beer (Bromeliaceae) da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus** (Série Ciências Biológicas), Feira de Santana, v. 6, n. 1, p.3-8, 2006